

3. Improvements in fluorescence microscopy allowed by high power light emitting diodes / G. Mazzini [et al.] FORMATEX Microscopy Book Series (N° 2) Current Issues on Multidisciplinary Microscopy Research and Education. p.181-188 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.formatex.org/microscopy2/papers/181-188.pdf>

4. Гонсалес, Р. Цифровая обработка изображений в среде MATLAB/ Р.Гонсалес, Р.Вуд, С. Эддинс. – М. : Техносфера, 2006. – 616 с.

УДК 617-089/618-085.33

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
СТРЕПТОКОККОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ С УЧЕТОМ ИХ
СПОСОБНОСТИ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКИ**

**Какойченкова А.К., Окулич В.К., Радченко Ю.В., Пинчук А.Н.,
Плотников Ф.В., Кабанова А.А., Копытов Д.А.**

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Актуальность. Гнойно-воспалительные заболевания остаются главной медико-социальной проблемой современного здравоохранения. Отсутствие ранней диагностики и своевременного начала этиотропной терапии при сепсисе увеличивает число летальных случаев в отделениях стационаров[1]. Одним из важных механизмов антибиотико-резистентности у микроорганизмов является их способность формировать устойчивые сообщества – биопленки[1,4]. Разработана тест-система «АБ-СТРБ», которая одновременно позволяет определять чувствительность 4-х микроорганизмов к 19 антибиотикам, что дает ей удобство использования и определяет высокую фармакоэкономическую эффективность. В настоящее время разработка проходит комплекс клинических испытаний.

Введение. Одними из распространенных возбудителей госпитальной и внегоспитальной септической патологии являются Грам(+) бактерии рода *Streptococcus*. В изученной литературе указано, что одним из механизмов антибиотикорезистентности стрептококков является их способность формировать биопленки и обмениваться генами резистентности в системе *Quorum Sensing*. Таким образом, создание методов позволяющих одновременно определять резистентность микроорганизмов к этиотропной терапии и их способность образовывать биопленки [3].

Цель исследования. Разработать тест-систему для определения микробной резистентности стрептококков с учетом способности микроорганизмов формировать биоплёнку.

Материал и методы Выбор вида биологического материала осуществлялся с учетом клинического диагноза. Взятие материала производили в первые сутки после поступления пациента в стационар до назначения антибактериальной терапии.

Согласно инструкции по применению № 075-0210 «Микробиологические методы исследования биологического материала», утвержденной Министерством Здравоохранения Республики Беларусь 13.03.2010 г., для исследования выделяли чистые культуры микроорганизмов или материал изолированных колоний с плотных питательных сред после первичного посева образца клинического материала (в последнем случае параллельно необходимо проведение идентификации культуры).

Индикация биопленки производилась спектрофотометрически с помощью окраски раствором кристаллического фиолетового с определением массы микробной биоплёнки. Для определения массы, полученные на спектрофотометре значения оптической плотности (Еоп), переводили в вес микробной по формуле:

$X = 226,28 \cdot E_{оп} \cdot 1,28$, где X – искомая масса биопленки в лунке, Eоп – оптическая плотность лунки [2].

Результаты и обсуждение. Для определения чувствительности стрептококков к антимикробным препаратам с учетом способности микроорганизмов формировать биоплёнку нами разработана тест-система «АБ-СТРБ», основой которой является 96-луночный планшет для ИФА, содержащий 8 рядов по 12 лунок и позволяющий определять чувствительность 4-х микроорганизмов к 19 антибиотикам.

Для определения чувствительности к антибиотикам у стрептококков использовались амикацин, амоксициллин+клавулат, ампициллин+сульбактам, бензилпенициллин, имипенем, линезолид, меропенем, моксифлоксацин, ципрофлоксацин; у энтерококков – ампициллин Е, ванкомицин Е, гентамицин Е, левофлоксацин Е, стрептомицин Е, тетрациклин Е, тигециклин Е, фосфомицин Е, хлорамфеникол Е, эритромицин Е («АБ-СТРБ» №1). Антибиотики (моксифлоксацин, левофлоксацин, ципрофлоксацин, тигециклин, линезолид и фосфомицин) для определения чувствительности стрептококков, образующих биопленку, использовались в тест-системе «АБ-СТРБ» №2.

Для постановки тест-системы «АБ-СТРБ» по определению чувствительности готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической петлей вносили одну или более колоний, выращенных на 5% кровяном Колумбия-агаре в течение 18-24 ч при 37°C, в ампулу с 2 мл стерильного раствора NaCl с массовой долей 0,9%. Оптическая плотность взвеси в ампуле после внесения микроорганизма должна была соответствовать 0,5 единиц МакФарланда. Приготовленную суспензию переносили в ампулу с питательной АБ средой 200 мкл приготовленной взвеси бактерий и тщательно перемешивали, после чего вносили в каждую лунку планшета по 135 мкл питательной среды АБ с микроорганизмами. Планшет накрывали крышкой и инкубировали 18-24 ч при 36±2°C в микроаэрофильных условиях с добавлением 5-10% CO₂. [4].

При визуальном учете определение чувствительности проводилось на основании подавления роста микроорганизмов под действием различных концентраций антибиотиков. Инструментальный учёт производился с помощью многоканального спектрофотометра АИФ Ф300 на длине волны 570 нм и компьютера с программным обеспечением (программа bactoSTREP зарегистрирована в Национальном центре интеллектуальной собственности, №954 от 06.06.2017).

Тест-системой «АБ-СТРБ» была изучена антибиотикорезистентность у 18 изолятов микроорганизмов, 8 из которых относились к бактериям рода *Streptococcus* (в том числе штамм ATCC №13813 – *S. agalacticae*), 10 – к бактериям рода *Enterococcus* (рисунок 1 и 2).

Рисунок 1 – Анализ резистентности стрептококков к антибиотикам



Рисунок 2 – Анализ резистентности энтерококков к антибиотикам

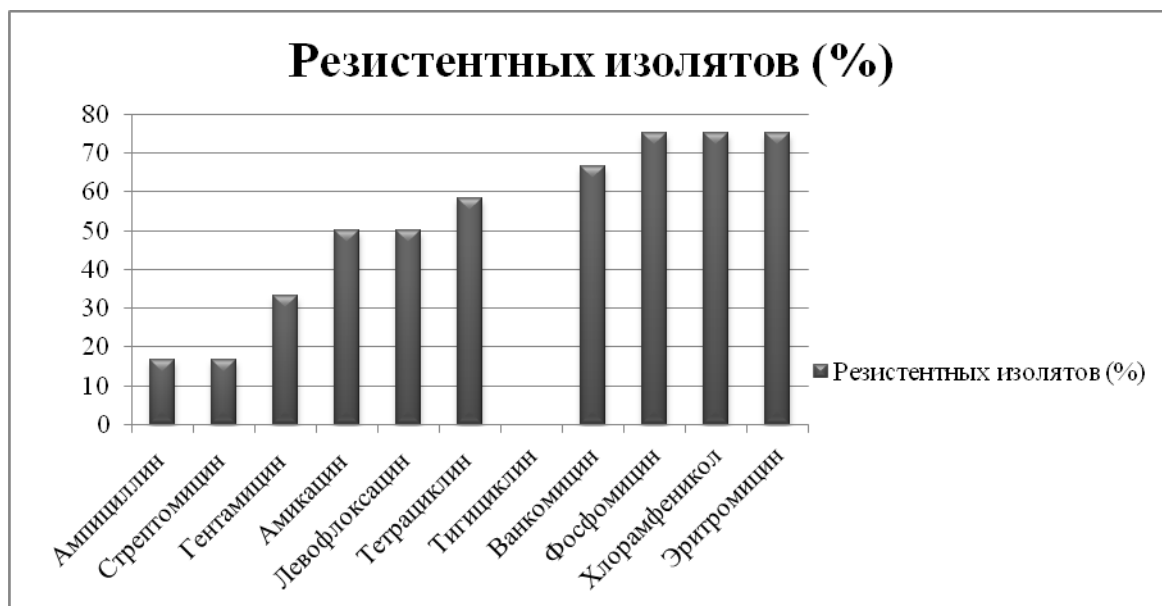


Рисунок 3 – Сравнительная характеристика оценки массы биопленки

| <i>Род. Streptococcus</i> (мкг/лунку) | <i>Род Enterococcus.</i> (мкг/лунку) |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 7.927 ± 4.211 | 23.5 ± 17.36 |

Наиболее активны в отношении образования биопленки показали себя изоляты рода *Enterococcus*. [Рис. 3]

Выводы.

1. Разработанная тест-система «АБ-СТРБ» позволяет одномоментно определить чувствительность стрептококков и энтерококков к полному спектру антибактериальных препаратов, используемых в клинике, с целью раннего назначения адекватной антибиотикотерапии для лечения гнойно-воспалительных заболеваний.
2. Компьютерная программа bactoSTREP позволяет определять резистентность стрептококков и энтерококков к антибиотикам с учетом способности образовывать биопленку.
3. Бактерии рода *Enterococcus* наиболее активны в отношении образования биопленки, что определяет их высокую резистентность к антимикробным препаратам.

Литература^

1. Стрептококки и пневмококки / А. А. Баранов [и др.]. – Ростов н/Д: «Феникс», 2013. – 301 с.
2. Покровский, В. И. Стрептококки и стрептококкозы / В. И. Покровский, Н. И. Брико, Л. А. Ряпис. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 544 с.
3. Acker, HV. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms / H.V. Acker, P.V. Dijck, T. Coenye // Trends Microbiol. – 2014. – Vol. 22, N 6. – P. 326–333.
4. Окулич, В.К. Роль микробных биопленок в патогенезе инфекционных процессов на современном этапе / В.К. Окулич, Ф.В. Плотников, А.А. Кабанова // Иммунология, аллергология, инфектология. – 2012. – №4.